高速アミノ酸分析用充てんカラム

TSK-GEL Aminopakタイプ

取扱説明書

ご使用の前に

- 本製品を使用する前に，必ずこの取扱説明書をよく読んで理解してください．
- この取扱説明書は，手近な所に大切に保管し，必要なときにいつでも取り出せるようにしてください．
- 製品本来の使用方法および取扱説明書で指定した使用方法を守ってください．
- 本書の安全に関する指示に対しては，指示内容を理解の上，必ず従ってください．

以上の指示を必ず厳守してください．
指示に従わないと，けがや事故の恐れがあります．

【取扱説明書について】

- 取扱説明書の内容は，製品の性能・機能の向上により将来予告なしに変更することがあります．
- 取扱説明書の全部または一部を無断で転載，複製することは禁止しています．
- 取扱説明書を紛失したときは，弊社営業担当者までお問い合わせください．
- 取扱説明書の内容に関しては万全を期していますが，万一不審な点や誤り，記載漏れに気づいたときは，お手数ですが巻末の連絡先までご連絡ください．

安全上のご注意

- ご使用の前に，この「安全上のご注意」をよくお読みのうえ，正しくお使いください．
- この項目は，いずれも安全に関する内容ですので，必ず守ってください．
- 「警告」「注意」の意味は次のようになっています．

⚠ 警告	取扱いを誤った場合，使用者が死亡または重傷を負う可能性が想定されるもの．
⚠ 注意	取扱いを誤った場合，使用者が傷害を負う可能性が想定されるものまたは物的損害の発生が想定されるもの．

ご使用時

- **火気厳禁**
  - 引火性のある溶媒を使用する場合，火気の使用は厳禁です．火災，爆発の原因になります．

⚠ 注意

- **換気に注意を**
  - 引火性，毒性のある溶媒を使用する場合，十分換気をしないと火災，爆発，中毒の原因になります．
- **液漏れに注意を**
  - 溶媒等の液漏れは，感電，中毒，薬傷，火災，腐食などの原因になります．液漏れの場合は，適切な保護具を付けた上で，液を取り除いてください．

⚠ 注意

●保護具の着用を

●有機溶媒や酸などの溶離液を取扱う場合は，保護メガネ，手袋などの保護具をご使用ください．薬傷を負う恐れがあります．

●取扱いに注意を

●取扱いが不適切であると，カラムの性能を損なうことがあります．取扱いには十分注意してください．

●適切な使用方法を

●本カラムはHLC－725CA専用カラムです．他の機器には使用できません．

●圧力に注意を

●急激な圧力上昇は，カラムの性能を損なう原因になります．又，カラム材質により破裂，飛散等の可能性があります．規定以上の圧力にならぬように注意してください．適切な保護具を付けた上で，十分注意して作業をおこなってください．

●分離精製物の取扱いに注意を

●得られた分離精製物または精製溶液を製品および中間体として使用する場合は，十分にその安全性の確認をおこなってご使用ください．

●処分には適切な処理を

●廃棄する場合は，産業廃棄物として適切な処理をおこなってください．

【その他の注意】

i 製品本体に警告表示ラベルが貼付されている製品は，表示内容を確認し，安全にご利用ください．

i 警告表示ラベルが，汚損または剥離し表示内容がわからなくなった場合には，当社窓口担当者までお申し付けください．貼り替え用ラベルをお送りいたします．

i 本書は大切に保存してください．また，ご利用者が代わる場合には次のご利用者にお渡しください．

取扱い上のご注意（出荷溶媒に関する注意）

応急措置	眼に入った場合	● 流水で15分以上洗眼する．その際は瞼を開き水が全面にゆきわたるようにおこなう． ● 医師の手当を受ける．
	皮膚に付着した場合	● 水等で洗い流す．
	吸入した場合	● 空気の新鮮な場所に移動しうがいをおこなう．
	飲み込んだ場合	● 口腔を水洗し，医師の手当を受ける．
取扱いおよび保管上の注意	取扱い時の保護具	● 取扱いの際は安全メガネを着用する．
	保管温度条件	● −10～0℃付近で凍結する可能性があるので保管温度に注意する．
廃棄上の注意	一般的な留意事項等	● 処分作業は取扱いおよび保管上の注意事項に留意しておこなう．

□出荷溶媒；クエン酸バッファー

取扱い上のご注意（充てん剤に関する注意）

応急措置	眼に入った場合	●流水で15分以上洗眼する．その際は瞼を開き水が全面にゆきわたるようにおこなう． ●医師の手当てを受ける．
	皮膚に付着した場合	●水等で洗い流す．
	吸入した場合	●空気の新鮮な場所に移動しうがいをおこなう．
	飲み込んだ場合	●口腔を水洗し，医師の手当てを受ける．
取扱いおよび保管上の注意	火気等の注意	●火気の使用を禁じ火花の発生を防止するための防爆工具の使用および接地等をおこなう．
	換気	●換気設備などで換気する．
	取扱い時の保護具	●取扱いの際は保護メガネおよび防じんマスクを着用する．
廃棄上の注意	処分方法	●廃棄する場合は焼却設備等で少量ずつ焼却処分をおこなう．
	一般的な留意事項等	●処分作業は可燃物の取扱いおよび保管上の注意事項に留意しておこなう．
	処分上の注意	●焼却処分する場合は，硫黄酸化物ガスおよび窒素酸化物ガスを発生するので排ガス対策をおこなう．

□充てん剤；可燃性充てん剤（スチレン－ジビニルベンゼン共重合物）

目　次

2004年4月改訂

1. はじめに

TSKgel Aminopakは高速イオン交換クロマトグラフィ法によるアミノ酸分析用に開発された充てんカラムです.

すなわちポストカラム反応法（ニンヒドリン法，OPA法など）による高速アミノ酸分析に適するようにデザインされています．充てん剤の粒子径が小さく，高分離能を示します.

TSKgel Aminopakの性能を十分に発揮させて，効果的にご使用いただくために，ご使用の前にこの取扱説明書をよくお読みのうえ，正しくご使用くださいますようお願いいたします.

特に，はじめてこのカラムをご使用くださる方は弊社発行の分析マニュアル（タンパク質構成アミノ酸の分析，ニンヒドリン法およびOPA法）をご参照ください.

2. ご使用の前に

まず，梱包状態およびカラムの外観に異常はないか確かめてください.

図1　梱 包 外 観 図

つぎに，カラムと別に次の物品が入っていますので，ご確認ください.

¡ 取扱説明書……………………………………… 1 通
¡ 検査票（INSPECTION DATA）…………… 1 通

3．カラム各部の名称
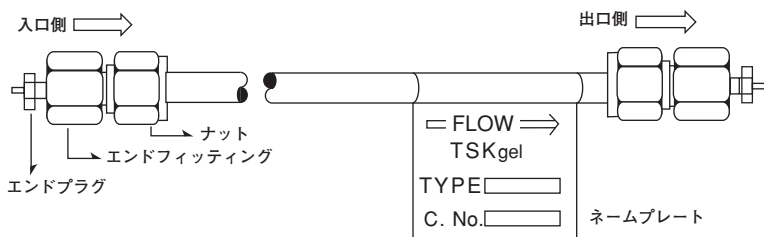
図２　カラムの見取図

4．使用上の注意事項

4-1　使用条件

アミノ酸分析（ニンヒドリン法，OPA法）での標準測定条件は第８項に示しますが，一般的使用範囲を以下に示します.

4-1-1　流速と圧力

最大使用流速　：　0.4mL/min（ただし55℃において）
最大カラム圧損　：　8.0MPa

4-1-2　溶離液

ｐ　Ｈ　範　囲　：　2.0～14.0
塩　　濃　　度　：　1.5mol/L以下
対　イ　オ　ン　：　ナトリウムイオン
水溶性有機溶媒添加可能範囲　：　20vol％以下

4-1-3　温度

25～80℃の範囲でご使用ください．しかし温度が低い程一般に溶離液の粘度が上昇することを考慮して粘度が高い場合は低い流速でご使用ください.

4-2　試料溶液の調整

4-2-1　試料溶液中の不溶分

遠心分離やマイクロポアフィルタ（0.45μm以下）によるろ過精製を必ずおこなってください．肉眼では見ることはできなくとも，不溶分が存在する可能性があります.（試料は，できるだけマイクロポアフィルタでろ過されることをおすすめします.）

4-2-2　試料溶液の組成

試料溶液の塩濃度，有機溶媒濃度は少ない程好ましく，またpHは初期溶離液に近くしてください．塩濃度が初期溶離液よりも高い場合は蒸留水等で希釈して注入してください．

また，溶離液と混合することにより，不溶性物質を生成するような物質を含む試料は，注入できませんのでご注意ください．

4-3　装置へのセット

4-3-1　カラムの通液方向

図２に示した矢印の方向，すなわちネームプレートのFLOWの矢印のとおりに使用してください．逆方向に長時間液を流すと，カラムの性能が低下します．

4-3-2　気泡の混入防止

カラム内に気泡を入れますと，チャンネリング等により性能が低下します．したがってカラム装着は，以下操作法にしたがっておこなってください．

操作法：送液ポンプ流速を0.3mL/minに設定し，ポンプを始動したのち，溶離液の流出を確認し，カラム出口側エンドフィッティングと装置を接続し，逆方向に通液してください．入口側エンドフィッティングより液がにじみ出て，気泡が出て来ないことを確認したならば，カラムを順方向に接続し直してください．

4-3-3　脈流対策

送液ポンプは市販の高速液体クロマトグラフィ用定流量ポンプを使用しますが，一般にカラムは脈流によってカラム性能が低下する傾向があります．したがって脈動のないものをご使用ください．もし脈動のあるポンプをご使用の場合はパルスダンパ（アキュームレータ）を接続して脈動を消去してください．

4-4　装置の停止

測定終了後装置の停止は以下の操作法にしたがっておこなってください．

操作法　a　溶離液側，再生液，第１液の順に流しカラムを第１液に置換後，流速を0.3mL/minに変更してください．反応液側，洗浄液を流し反応コイルを置換してください．

s　反応槽，カラム恒温槽を停止し50℃以下に冷却してください．

d　溶離液ポンプおよび反応液ポンプを停止してください．

4-5　装置の停止後のカラムの保存

4-5-1　再使用まで短期間の場合（1週間未満）

カラムを装置に接続したままで結構です.

4-5-2　再使用まで1週間以上の場合

カラムを装置からはずし，カラム両端のエンドフィッティングのエンドプラグ取り付け部を蒸留水で洗浄後，エンドプラグを使って封をしてください.

4-5-3　保存条件

温　　度	室温（好ましくは15～30℃）にて，できるだけ温度差の少ない場所に保存してください. 0℃以下の場所に放置した場合には凍結の可能性があり，カラムの劣化の原因となります.
直射日光	避けてください.
腐食性ガス	発生しない安全な場所に保存してください.

5．理論段数，非対称係数の測定

カラムの理論段数，非対称係数および測定条件は，検査票（INSPECTION DATA）記載のとおりです.

5-1　理論段数計算法
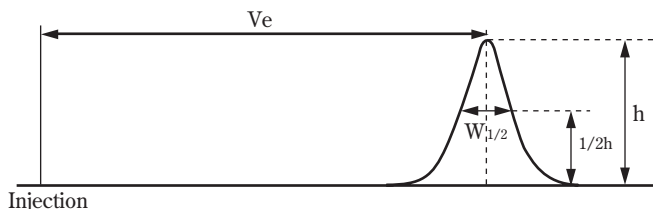
図3　TSK-GEL　理論段数計算法

カラムの理論段数は，半値幅法により計算をおこなっており，カラム当りの段数で表示してあります.

$N = 5.54\ (Ve / W_{1/2})^2$

Ve　：　溶出量

$W_{1/2}$　：　ピーク半値幅

h　：　ピーク高さ

N　：　カラム当りの理論段数

5-2　非対称係数計算法
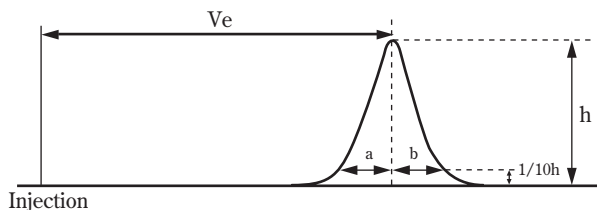
図 4　TSK-GEL　非対称係数計算法

カラムの非対象係数は，1／10h法により計算をおこなっています．

As＝b／a

As　：　非対象係数

なお，カラム検定は，（できるだけデッドボリュームを小さくした）当社HLC装置で測定しております．

5-3　デッドボリュームの影響

デッドボリュームの大きい装置を使用した場合，あるいは注入量を多くした場合は，規格値よりも低い理論段数を示すことがありますので，注意してください．

6．トラブル発生時の処置法

TSK－GEL使用中，もし下記のようなトラブルが発生した場合，下記の手順にしたがってチェックをし，適切な処置をおこなってください．処置が適切であれば，元どおりに近い性能に回復することがありますが，カラムの寿命，吸着物質，気泡の混入，乾燥，凍結等が原因の場合には，元どおりの性能は得られませんので，カラムの取り扱いには十分な注意を払ってください．

6-1　カラムエンドフィッティングトラブル

試料を注入後に急激な流量低下をみた場合，同一流量でカラム購入時より大きく会圧損が増大した場合，あるいはエンドフィッティングのスウェジロックが破損した場合，以下に述べる6-1-1～6-1-3項の処置や確認をおこなってください．

6-1-1　つまり物の押し出しまたはエンドフィッティングの交換

カラムを装置より取りはずし，出口側エンドフィッティングをポンプ側配管に接続し通常の流速で送液して，入口側エンドフィッティングにつまったものをカラム外に押し出してください．出口側エンドフィッティングがつまった場合には逆の操作をおこなってください．これでもつまったものが取れない場合，あるいはエンドフィッティングが破損した場合は，6-1-2項の手順にしたがってエンドフィッティングの交換をおこなってください．

6-1-2　エンドフィッティングの交換

新しいエンドフィッティングを用意し，つまったエンドフィッティングをカラムより取りはずします．この際，ゲルが外部に漏れないよう細心の注意を払ってください．取りはずしたエンドフィッティングに残っているゲルを，新しいエンドフィッティングに移しカラムに取りつけます．

6-1-3　エンドフィッティングの交換後

これの交換が終りましたら，6-3-2項を参考にして，新しいエンドフィッティング側の気泡を取り除いた後，理論段数を測定し，段数の低下が起っていないか確認してください．

6-2　分離能が急激に低下した場合

反応系を除いてカラムの理論段数を測定してください．理論段数が正常であればカラム以外に原因があると思われますので，他の部分の異常を探してください．

もし理論段数に異常があれば，カラムの性能低下と考えられます．以下の処置をおこなってください．

カラム系の分離能が低下する原因を，以下6-2-1～3項に示します．

6-2-1　エンドフィッティングに不溶物がつまり流路が乱れを生じる場合

6-1項を参考にしてエンドフィッティングの洗浄または交換後，理論段数を測定してください．

6-2-2　カラム入口側のすき間

4-1項に示す範囲外の使用条件（圧力，流速，溶媒組織，温度）を使用したり，4-2項に示す試料や溶離液中の不溶分への考慮をしなかった場合，カラムの液流入側にすき間が生じる場合があります．この場合単一物質試料のピークの形が大きくテーリングしたり，ピークが２つに割れたりします．この場合はもうこのカラムは再生不能です．

6-2-3　吸着物質が蓄積した場合

吸着し易い物質の例としては塩基性タンパク質やポリアミンなどが考えられますが，8-1-3または8-2-3に示す再生液で通常は除去されます．不十分な場合は再生液の送液時間を延長して洗浄してください．

7．品質規格および保証

7-1　検査票（INSPECTION DATA）

おのおのカラムの検定結果は検査票に記載のとおりです．

このうち，理論段数はカラム当りの理論段数で，圧力は検定流速での圧力を表示してあります．検定条件は下記に述べます．

7-2　検定溶媒および出荷時溶媒

ニンヒドリン法第２液，参考資料8-1-3の表１をご参照ください．

7-3　検定条件

試　　　料　：　チロシン　0.1mg/mL，20μL注入
溶　離　液　：　ニンヒドリン法第２液（8-1-3　表１）
流　　　量　：　0.4mL/min
カラム恒温槽温度　：　55℃
検　出　器　：　紫外吸光検出器（波長280nm）

7-4　品質規格

TSKgel Aminopakは以下の規格で出荷されております．

品　　　名	品番	カラムサイズ (内径(mm)×長さ(cm))	理論段数 (TP/column)	非対称係数
TSKgel Aminopak	13181	4.6×12	1,250	1.00～1.35

7-5　保証

a　現品到着後，検査票並びにこの取扱説明書に記載の条件で，カラムの理論段数および非対称係数をチェックしてください．当社の責任で規格値を外れている場合には良品と交換いたします．

s　輸送中の事故などで，カラムに破損が認められる場合には良品と交換いたします．

d　上記，品質不良につきましては，現品到着後，２週間以内にご連絡ください．２週間を過ぎた場合は良品としてお受取りいただいたものとみなします．

f　カラムの寿命については，保証の対象外といたします．

g　商品の仕様は，改良のため予告なく変更することがあります．

8．参考資料　ーアミノ酸分析条件についてー

8-1　ニンヒドリン法

8-1-1　基本装置構成および部品

™ 溶離液ポンプ
™ 反応液ポンプ（レシプロ型または同等のもの）
™ グラジェント装置（時間設定ステップグラジェント）
™ カラム恒温槽（55℃）
™ 反応槽（110℃）
™ 紫外可視吸光検出器　２台（440および570nm）
™ 記録計またはデータ処理装置
™ 反応チューブ　ステンレス製　内径0.25mm，長さ10m
™ アンモニアトラップカラム
　（注）8-3アンモニアトラップカラムの項をご参照ください．
™ インジェクションバルブ（300 μL以下）

8-1-2　流路図

以下の図５に示します.
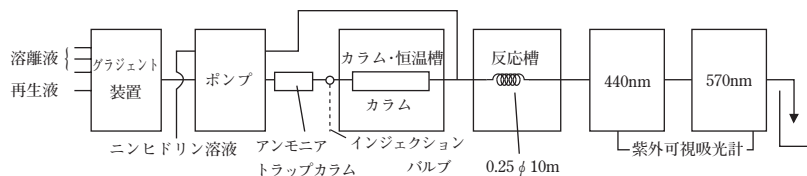
図５　ニンヒドリン法標準流路図

（注）インジェクションバルブ以後のリードパイプは0.25mm内径の1/16インチステンレスパイプをご使用ください.

8-1-3　溶離液と再生液

溶離液組成を表１に示します.

表１　溶 離 液 組 成

薬　品　名	第 1 液	第 2 液	第 3 液
クエン酸３ナトリウム２水和物	19.6g/L	19.6g/L	14.7g/L
クエン酸	28.0g/L	14.0g/L	—
エタノール	80mL/L	—	—
β－チオジグリコール	5.0mL/L	5.0mL/L	—
n－カプリル酸	0.1mL/L	0.1mL/L	0.1mL/L
30%　Bri－35	3.3mL/L	3.3mL/L	3.3mL/L
４ホウ酸ナトリウム10水和物	—	—	9.5g/L
塩化ナトリウム	—	—	35.1g/L
pH	3.26	4.30	9.40

いずれの場合もpHは塩酸で調整してください.

再生液　0.2N　水酸化ナトリウム水溶液

以上溶離液および再生液の調製用の純水は蒸留水（液体クロマトグラフィー用）または超純水をご使用ください.

8-1-4　反応液

ニンヒドリン溶液

　アミノ酸自動分析用ニンヒドリン溶液使用（品番　6899）

洗 浄 液

　0.1mL/L　nーカプリル酸水溶液

8-1-5　測定条件

試料注入容量　：　適正範囲（10～300 μL）

溶離液流速　：　0.4mL/min

カラム温度　：　55℃

反応液流速　：　0.4mL/min

反応温度　：　110℃

基本溶離液切り換え時間　：　第１液　サンプル注入後

　：　第２液　11分後

　：　第３液　34分後

　：　再生液　39分後

第１液平衡化時間　30分以上（一定にしてください）

なお装置の機種，配管容量や充てん剤ロット差によって，溶離液の切り換えのタイミングを調節する必要があります．

8-2　OPA法

8-2-1　基本装置構成および部品

™ 溶離液ポンプ

™ 反応液ポンプ

™ グラジェント装置（時間設定ステップグラジェント）

™ カラム恒温槽（反応槽兼用，55℃）

™ 蛍光検出器

™ 記録計またはデータ処理装置

™ 三方分岐ブロック（品番　9001）　抵抗管（品番　6783）

　S―Tユニオン（品番　7540）

　予熱コイル（テフロンチューブ　内径0.5mm，長さ1m）

　反応コイル（テフロンチューブ　内径0.25mm，長さ5m）

™ アンモニアトラップカラム

　（注）8-3アンモニアトラップカラムの項をご参照ください．

™ インジェクションバルブ（100 μL以下）

8-2-2　流路図
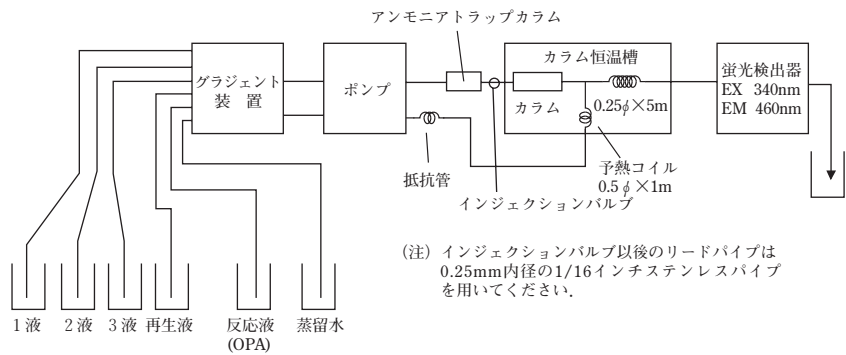
図6　OPA法標準流路図

8-2-3　溶離液と再生液

溶離液組成を表2に示します.

表2　溶 離 液 組 成

薬　品　名	第 1 液	第 2 液	第 3 液
クエン酸3ナトリウム2水和物	19.6g/L	19.6g/L	14.7g/L
エタノール	80mL/L	—	—
n—カプリル酸	0.1mL/L	0.1mL/L	0.1mL/L
塩化ナトリウム	—	—	35.1g/L
4ホウ酸ナトリウム10水和物	—	—	9.5g/L
pH	3.26	4.30	9.40

いずれの場合もpHは塩酸で調整してください.

再生液　8.0g/L　水酸化ナトリウム, 0.1mL/L　n—カプリル酸水溶液

溶離液および再生液の調製用の純水は蒸留水（和光純薬液体クロマトグラフィー用または大塚アッセイ注射用）をご使用ください.

8-2-4　反応液

オルトフタルアルデヒド（OPA）	1000mg/L
水酸化ナトリウム	16g/L
ホウ酸	24.7g/L
メルカプトエタノール	2mL/L
エタノール	10mL/L
30％　Bri－35	3mL/L

使用する純水は溶離液用と同様です．

8-2-5　測定条件

試料注入容量　：　適正範囲　10～100μL
溶離液流速　：　0.4mL/min
カラムおよび反応温度　：　55℃
反応液流速　：　0.4mL/min
蛍光検出器　：　励起波長　340nm，検出蛍光波長　460nm

基本溶離液切り換え時間はニンヒドリン法と同様です．

ただし第１液平衡化時間は30～40分間で短かすぎても長すぎても好ましくありません．一定にしてください．なお，溶離液の切り換えのタイミングは装置の機種，配管容量，充てん剤のロット差によって調節する必要があります．

8-3　アンモニアトラップカラム

8-3-1　役割

アンモニアトラップカラムは，溶離液中に微量存在するアンモニアに起因するアンモニアプラトー（第３液溶出時に出現する台形のベースライン変動）を最小限に抑制するために用いられます．したがって，第３液で溶出するヒスチジン，リジン，アンモニア，トリプトファン，アルギニンの分析眼界や制度を向上するために必要です．

8-3-2　アンモニアトラップカラムの調製法

手　順

a　空カラムとして，内径４mm，長さ10cmのカラム（品番　07617）を用意してください．

s　純水でカラム部品を洗浄した後，液出口側のエンドフィッティングをしっかり取り付けてください．出口側を下にしてカラムを垂直に立ててクランプなどで保持してください．

d　アンモニアトラップ用充てん剤MCI　GEL®　AFR－２（三菱化成製）をガラ

スフィルター上で５N塩酸，純水，１N水酸化ナトリウム，純水の順に充てん剤の約４倍容量でそれぞれ２回ずつ洗浄し，充てん剤をサクションドライ状態でビーカーに取り出し，1/2～１容量の0.5mol/L硫酸ナトリウム溶液を加えて濃厚スラリーを作ってください．

f　上記スラリーをスポイドで吸上げs で準備したカラムの入口に注入し，スラリーで満たしてください．５分間静置後，上澄み液をスポイドで除去し，再びスラリーを注入してください．この操作を３～４回繰り返した後，残った上澄みを除去し，薬サジで充てん剤ケーキをカラム内に押し込み，入口端面を水平にした後入口側エンドフィッティングをしっかり取り付けて完成してください．

9．おわりに

本取扱説明書の内容に関して，ご不明な点あるいはご質問等がありましたら，巻末の連絡先にご連絡ください．

以下の名称は東ソー株式会社の登録商標です.

HLC, TSK-GEL, TSKgel, TSKgel SuperMultipore,
BioAssist, Enantio, PStQuick,
エンバイロパック/Enviropak, トヨパール/TOYOPEARL, ToyoScreen,
TOYOPEARL GigaCap, トヨパールメガキャップ/TOYOPEARL MegaCap,
トヨパールパック/TOYOPEARLPAK, TOYOPAK

東ソー株式会社　バイオサイエンス事業部

東京本社	営業部	☎(03)5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店	バイオサイエンスG	☎(06)6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店	バイオサイエンスG	☎(052)211-5730	〒460-0003	名古屋市中区錦1-17-13
カスタマーサポートセンター		☎(0120)17-1200	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

Printed in Japan